12-11

First Strand cDNA Synthesis Kit

ReverTra Ace -α-®

(Code No. FSK-101)

RT-PCR Kit

ReverTra Dash®

(Code No. PCR-401)

取扱説明書

TOYOBO CO., LTD. Life Science Department
OSAKA JAPAN

A3280K

— 目次 —

[1] はじめに・・・

［1］はじめに

逆転写 (Reverse Transcription；RT) 反応を PCR (Polymerase Chain Reaction) と組み合わせた RT-PCR 法は、比較的簡便かつ迅速に、多数のサンプルからRNAの検出を行うことが可能な手法です。そのため、mRNA 発現の有無、発現量、長さの異常といった RNA の解析や cDNA クローニングの手段として近年広く一般的な方法として用いられるようになりました。

弊社では MMLV (Molony murine leukemia virus) 由来の逆転写酵素を遺伝子工学的手法を用いて改変し、長鎖の cDNA 合成を妨げる RNase H 活性を欠失させ、さらに cDNA 合成能を大幅にアップさせた改良型酵素である ReverTra Ace® の開発に成功しました。本製品は このReverTra Ace®の優れた cDNA 合成能を活かした、 First strand cDNA 合成キット及び RT-PCR キットです。

ReverTra Ace -α-®は、ReverTra Ace®を用いた First strand cDNA 合成キットです。RT用のプライマー、Positive Control を揃えているため、手軽に逆転写反応を行うことができます。お手持ちの各種DNAポリメラーゼによる PCR 反応のためのテンプレートの作製にもご利用いただけます。例えば、High fidelity PCR 用酵素、long PCR 用酵素等と組み合わせることにより、より目的に応じた RT-PCR が可能です。

ReverTra Dash®は、ReverTra Ace®と増幅効率、反応スピードに優れた DNA ポリメラーゼである KOD Dashを組み合わせた高感度の RT-PCR キットです。RT 反応と PCR を同一チューブ内で行うことが可能です。RNA の解析、cDNA クローニングを簡便に効率よく行えます。

本製品には、以下の特徴があります。

1. 高い cDNA 合成能

本製品で使用している ReverTra Ace®は cDNA 合成能を大幅にアップさせた改良型酵素です。14 kb 以上の cDNA 合成を確認しています。

2. 高い検出感度

ReverTra Ace -α-®は、逆転写反応液を全量持ち込んでも PCR 反応を阻害しないように至適化しているため、種々の DNA ポリメラーゼを用いて RT 反応と同一チューブ内で PCR 反応を行うことが可能です。

ReverTra Dash®は、cDNA 合成能に優れた ReverTra Ace®に加え、増幅効率及び伸長速度に優れた PCR 用酵素 KOD Dashを使用しており、バッファーを至適化しておりますので、迅速で高感度の検出が可能です。

10^5 コピーのポジティブコントロール RNA から、1μg 以上の増幅産物を確認しています。

[2] RT-PCR 法の原理

RT-PCR 法は、図1のように、鋳型 RNA から First Strand cDNA を合成する逆転写反応のステップと、この cDNA を鋳型として Second Strand cDNA を合成し、さらに目的の遺伝子断片を増幅する PCR のステップからなります。

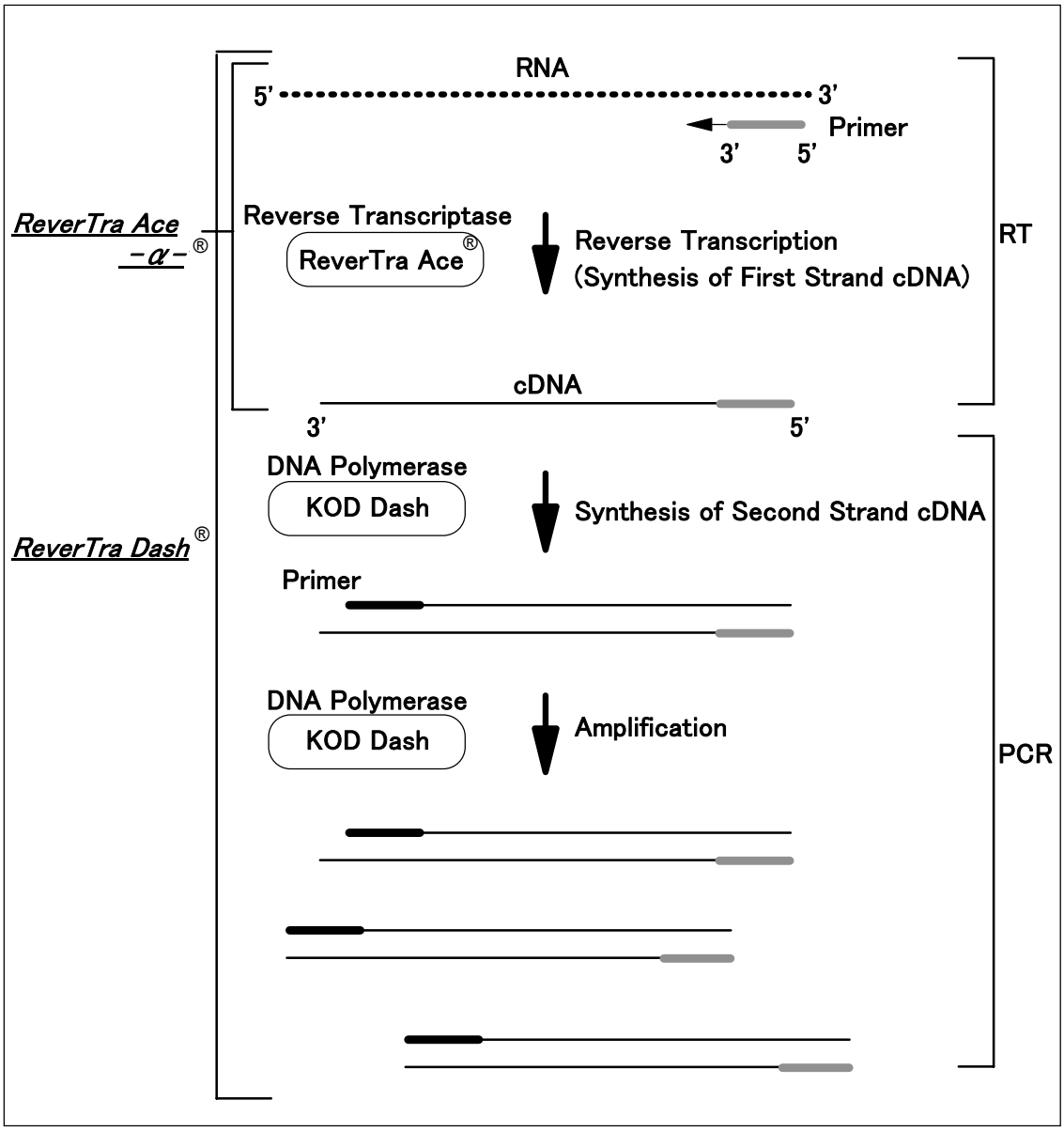

図1 RT-PCR法の原理

[3] キットに含まれているもの（-20℃保存）

			（100回用）
1	ReverTra Ace®		100 μl
2	5×RT Buffer	(25 mM Mg 含有)	400 μl
3	RNase Inhibitor	(10 U/μl)	100 μl
4	dNTP Mixture	(各10 mM)	200 μl
5	RNase Free H_2O		1200 μl
6	Oligo(dT)20	(10 pmol/μl)	100 μl
7	Random Primer	(25 pmol/μl)	100 μl
8	Control Primer F	(10 pmol/μl)	50 μl
9	Control Primer R	(10 pmol/μl)	50 μl
10	Positive Control RNA	(10^5 copies/μl)	50 μl
11	KOD Dash*	(2.5 U/μl)	100 μl
12	10×PCR Buffer*		1000 μl

*は、ReverTra Dash®のみに含まれています。

【各プライマーのシークエンス】

Oligo(dT)20

5'-$(dT)_{20}$-3'

Random Primer

5'-$(dN)_9$-3'

Control Primer F (G3PDH)

5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (20 mer)

Control Primer R (G3PDH)

5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (20 mer)

【添付プライマー】

G3PDH遺伝子用の配列特異的コントロールプライマー（Control Primer F、R*）では 0.45 kb の PCR 産物が得られます。このプライマーは、Human 由来の G3PDH 遺伝子のほか、Rat 、Mouse 、Swine 等由来のものにもご利用いただけます。G3PDH 遺伝子は "Housekeeping Gene" であり、コントロール RNA のほか、大部分のトータル RNA に共通して適用できます。

このほか、Oligo(dT)20、Random Primerを添付しています。これらのプライマーの選定については後述の「添付プライマーの説明」（p. 9） をご参照ください。

*このプライマーセットを用いた場合、cDNAから得られる増幅産物と同じサイズの増幅産物がゲノムDNAより得られる場合があります。これはおそらくシュードジーンに由来するものと思われます。このため、RT-PCRを行う際には、DNase I処理したRNAを使用し、また、RT反応を行わないネガティブコントロールを取ることをおすすめします。

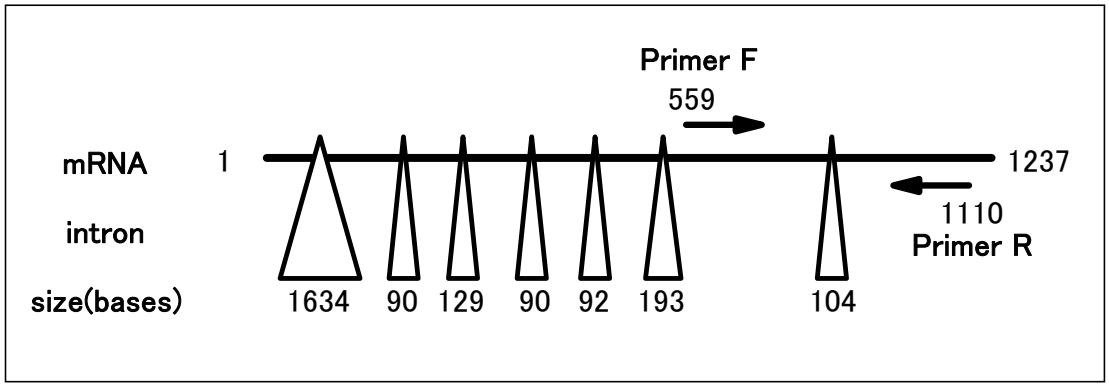

図2　Control Primer F、Rのロケーション

【Positive Control RNA】

本キットはポジティブコントロール用RNAとして、Human G3PDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) 遺伝子の *in vitro* 転写産物が添付されています（3'末端には22 mer の poly(A) tail が付加されています）（図3参照）。

G3PDH 遺伝子は、様々な哺乳類の組織で発現している "Housekeeping Gene" です。その mRNA 発現レベルは、一部のサイトカインや Tumor-promoting Phorbol Esters 等を含む誘導物質によっても影響を受けず、また、ほとんどの組織で一定していることが知られています。したがって、種々の組織から抽出したRNAサンプルをご利用いただく際に、最適なコントロールとしてご使用いただけます。

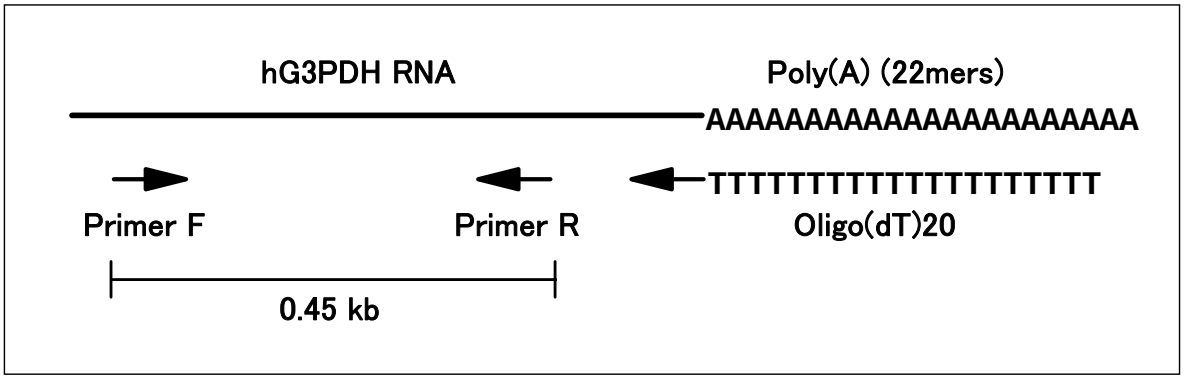

図3　ポジティブコントロールRNAと添付プライマー

[4] ご用意いただくもの

RT-PCRを行う際には、本製品のほかに以下のものが必要となります。

1. 試薬
   ・ミネラルオイル（必要に応じて）
   ・電気泳動用ゲル
   ・電気泳動用バッファー
   ・DNAサイズマーカー
   ・滅菌蒸留水（PCR グレード）

2. 機器・器具
   ・サーマルサイクラー
   ・ゲル電気泳動装置
   ・UVトランスイルミネーター及び撮影装置
   ・マイクロ遠心機
   ・PCR用チューブ

[5] プロトコール

1. 逆転写反応（ReverTra Dash®、ReverTra Ace －α－®共通）

試薬		使用量
RNase Free H_2O		(11-X)μl
5×RT Buffer		4μl
dNTP Mixture　(各10mM)		2μl
RNase Inhibitor (10U/μl)		1μl
Primer		
Random Primer*	(25 pmol/μl)	いずれか1μl
Oligo(dT)20	(10 pmol/μl)	
配列特異的下流プライマー**	(10 pmol/μl)	
RNA		
Total RNA	:1μg以下	いずれか1μl
mRNA	:10～100ng	
Positive Control RNA	:10^5copies(1μl)	
ReverTra Ace®		1μl***
Total Volume		20μl

↓ （30℃、10 min.）*
↓ 42℃、20 min.
↓ 99℃、 5 min.
↓ 4℃、 5 min.

↓ スピンダウン

【注】

* Random Primer をご使用の場合は、十分にアニールできるように、30℃、10分間のプレインキュベートを行ってください。

** テンプレートとしてPositive Control RNAを用いる場合はControl Primer Rをご使用いただけます。

*** 逆転写酵素は反応後にcDNAに結合しているため、99℃、5分間の熱処理を行いますが、必要以上に添加すると熱処理が不十分となり、PCR反応を阻害することがありますので、ご注意ください。

2. PCR

(1) ReverTra Dash®をご使用の場合

試薬	使用量
(1. 逆転写反応の)サンプル	20μl
滅菌蒸留水	67μl
10×PCR Buffer	10μl
配列特異的上流プライマー (10 pmol/μl)	1μl
配列特異的下流プライマー* (10 pmol/μl)	1μl
KOD Dash	1μl
Total Volume	100μl

↓ PCR**

(ターゲット長が1 kb程度の場合)

98℃	10 sec.	(30サイクル)
60℃	2 sec.	
74℃	30 sec.***	

↓ サンプルの一部をとって、アガロースゲル電気泳動を行い、
目的増幅断片の生成を確認する。

【注】

* 配列特異的下流プライマーを逆転写反応に用いた場合は、プライマーの代わりに滅菌蒸留水 1μlを加えてください。

** (98℃;10 sec.、70℃;30 sec.)×30 サイクル、のような 2 ステップの Fast モード PCR も可能です。ただし、高い感度を望まれる場合には上記の基本 PCR をお薦めします。

*** ターゲット長が1 kbを超える場合は、30 sec.～1 min./1 kbを目安に伸長時間を延長してください(KOD Dash の伸長速度は Taq の約 2 倍です)。

(2) ReverTra Ace-α-®をご使用の場合

基本的には、お手持ちの DNA ポリメラーゼの使用方法に従って下さい。以下に一般的な使用例を示します。

試薬	使用量
(1. 逆転写反応の)サンプル	20μl
滅菌蒸留水	67μl
10×PCR Buffer*	10μl
配列特異的上流プライマー (10 pmol/μl)	1μl
配列特異的下流プライマー** (10 pmol/μl)	1μl
DNA ポリメラーゼ (2.5 U/μl)	1μl
Total Volume	100μl

↓ PCR

(ターゲット長が1 kb程度の場合)

94℃	30 sec.
60℃	30 sec.
72℃	1min.***

(30サイクル)

↓ サンプルの一部をとって、アガロースゲル電気泳動を行い、
目的増幅断片の生成を確認する。

【注】

* Mg 別添の場合には、Mg も添加して下さい。

** 配列特異的下流プライマーを逆転写反応に用いた場合は、プライマーの代わりに滅菌蒸留水 1μlを加えてください。

*** 使用する酵素によりますが、Taq ポリメラーゼの場合、ターゲット長が1 kbを超える際には、通常 1 min./1 kb を目安に伸長時間を延長してください。

[6] 添付プライマーの説明

逆転写反応のプライマー選択の際には、以下の選択基準を参考にしてください。

1. 配列特異的下流プライマー（Control Primer R）

一般には、鋳型 RNA と相補的な配列を持つプライマーを用いる場合、ターゲットのシークエンスがわかっている必要があります。

2. Oligo(dT)20

poly(A) tail を有する mRNA の逆転写反応にのみご使用いただけます。原核生物の RNA、真核生物の rRNA や tRNA 等には使用できません。

3. Random Primer

poly(A) tail の有無を問わず、一般的にご使用いただけます。Random Primer で逆転写反応を行った場合、いかなるペアの配列特異的なプライマーによっても PCR を行うことができます。

Random Primer で逆転写反応を行う際には、プライマーが十分アニールできるように30℃、10分間のプレインキュベートを行ってください。

[7] RNA を取り扱う際の注意

1. RNase の混入をおさえる

RT-PCR法では、RNase の作用をおさえることが重要です。そのためには、使用器具および試薬類からの RNase の混入を防ぐとともに、純度の高い RNA サンプルを得ることが重要です。さらに、実験環境にご注意いただくとともに、唾液、汗等からの RNase の混入を防ぐため、マスク、手袋の着用をおすすめします。

2. 器具類について

実験器具は可能な限り、ディスポーザブルタイプのプラスチック製品をオートクレーブ滅菌して使用して下さい。ガラス器具をご使用になる際には、乾熱滅菌するか、もしくは0.1% Diethylpyrocarbonate (DEPC) 溶液に37℃、12時間浸せきした後、オートクレーブ（121℃、30分間）をかけたものを使用します。

[8] RT−PCR を行う際の注意

本製品は鋳型として、Total RNA、tRNA、mRNA、rRNA に適用できるように設計されておりますが、いずれの場合でも目的の増幅産物を効率良く得るために純度の高いRNAサンプルをご使用になることをお薦めします。

弊社MagExtractor™-RNA-(Code No.NPK-201F), Mag*ical Trapper*(Code No.MGS-101) もしくは 自動核酸抽出装置MagExtractor™ System MFXシリーズを用いると、簡便で短時間に高純度のTotal RNAを調製することができます。

[9] トラブルシューティング

1. 増幅バンドが確認できない、または、増幅効率が悪い。

原因		対策
鋳型RNA	・純度が悪い	・再調製する
	・鋳型量が少ない	・PCRのサイクル数を増やす ・鋳型量を増やす
	・劣化している	・再調製する。 ・使用頻度が高い場合は、あらかじめ少量ずつ分注しておく
	・高次構造を有する	・RTにRandom Primerを使用する ・酵素以外を入れたRT反応液を65℃で5分間、氷上で5分間置いた後、RTを行う
プライマー	・Tm値が低い	・アニーリング温度を下げる、またはプライマーを再設計する
	・配列が適切でない	・poly (A) tail を持たないRNAをRTのテンプレートとする場合、Oligo(dT)20は使用できない ・配列が正しいことを確認する ・プライマー内、あるいはプライマー間に相補的な領域がないことを確認する ・PCRのプライマー2つが同一鎖にアニールしないことを確認する
	・プライマー量が少ない	・1反応当り、10 pmol 以上使用する
PCR条件	・アニーリング温度が高い	・PCR条件を検討する
	・伸長時間が短い	・PCR条件を検討する
	・サーマルサイクラーの作動が適切でない	・動作が正常であるかを確認する
その他	・RNaseのコンタミ	・鋳型RNAを再調製する
	・酵素の失活	・コントロールRNAで確認する ・新しい酵素を使用する

2.非特異的なバンドが多い

原因		対策
鋳型RNA	・鋳型量が多すぎる ・ゲノムDNAのコンタミ	・鋳型量を減らす ・DNase Ⅰ 処理を行う ・逆転写反応を行っていないNegative Control も同時にPCRを行う
プライマー	・配列が適切でない ・プライマー量が多すぎる	・ターゲット領域以外にもアニーリングしやすい領域がある→プライマーを再設計する ・プライマー量を検討する
PCR条件	・アニーリング温度が低い	・アニーリング温度を上げる
その他	・サンプル間のコンタミネーション	・チップをこまめに交換する ・フィルターチップを用いる

[10] 参考文献

1. Takagi, M., Nisioka, M., Kakihara, H., Kitabayashi, M., Inoue, H., Kawakami, B., Oka, M., and Imanaka, T. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 4504-4510 (1997)

[11] 関連商品

●キット構成試薬の単品販売

品名	内容	Code No.
ReverTra Ace® ＜高効率逆転写酵素＞	10,000U×1本	TRT-101
KOD Dash ＜増幅効率に優れたPCR酵素＞	250U×1本 （250U×1本）×5 （250U×1本）×10	LDP-101 LDP-101X5 LDP-101X10
RNase Inhibitor, recombinant	2500U×1本 （2500U×1本）×5	SIN-201 SIN-201X5
dNTPs Mixture（10mM）	0.2ml	NTP-301
Oligo(dT)20	1 nmol	FSK-201
Random Primer (9mer)	2.5 nmol	FSK-301

●RNA抽出関連試薬

MagExtractor™-RNA- ＜Total RNA抽出用試薬キット＞	100回用	NPK-201F
Mag*ical Trapper* ＜磁性ビーズ分離用スタンド＞	1個	MGS-101

●他のRT-PCRキット

RT-PCR Quick Master Mix ＜Tth DNA Pol.を使用したワンステップRT-PCRキット＞	50回用	PCR-311
ReverTra -Plus- ＜ReverTra Ace + KOD-Plus-の高正確性RT-PCRキット＞	100回用	PCR-501

●リアルタイムPCR関連試薬

ReverTra Ace® qPCR RT Kit ＜リアルタイムPCR用cDNA合成キット＞	200回用	FSQ-101
Realtime PCR Master Mix ＜リアルタイムPCR用マスターミックス(プローブ検出用）＞	1ml×5本	QPK-101
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix ＜リアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR® Green I検出用)＞	1ml×5本	QPK-201
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix -Plus- ＜リアルタイムPCR用マスターミックス(SYBR® Green I検出用)＞	1ml×5本	QPK-212
THUNDERBIRD® Probe qPCR Mix ＜各種蛍光ﾌﾟﾛｰﾌﾞ・蛍光ﾌﾟﾗｲﾏｰ検出用リアルタイムPCR試薬＞	1ml×1本 1.67ml×3本	QPS-101T QPS-101
THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix ＜SYBR® Green I検出用リアルタイムPCR試薬＞	1ml×1本 1.67ml×3本	QPS-201T QPS-201

【製造・販売元】

ー納期・注文に関するお問い合わせー

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(大阪)
〒530-8230　大阪市北区堂島浜二丁目2番8号
TEL 06-6348-3786　FAX 06-6348-3833
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

東洋紡株式会社　ライフサイエンス事業部　(東京)
〒141-8633　東京都品川区東五反田二丁目10番2号　東五反田スクエア
TEL 03-6422-4819　FAX 03-6422-4951
E-mail : order_lifescience@toyobo.jp

ー製品の内容・技術に関するお問い合わせー

テクニカルライン
TEL 06-6348-3888　FAX 06-6348-3833
開設時間　9:00～12:00 , 13:00～17:00　(土、日、祝を除く)
E-mail : tech_osaka@toyobo.jp
［URL］ http://www.toyobo.co.jp/bio